

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 10015857 A

(43) Date of publication of application: 20.01.98

(51) Int. Cl

B25J 7/00
// **C12M 1/00**
C12N 11/00
C12N 15/00
H01L 49/00

(21) Application number: 08173731

(71) Applicant: SUMITOMO METAL IND LTD

(22) Date of filing: 03.07.96

(72) Inventor: MIKI AKIRA

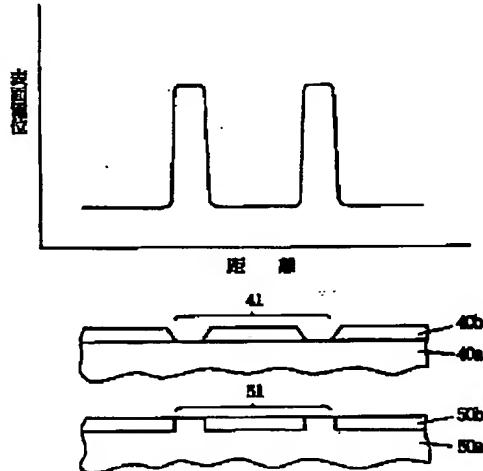
**(54) FIXATION DEVICE OF HIGH POLYMER
RELATING TO ORGANISM**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a device to fix a high polymer relating to organism such as a DNA by using the minute processing technology of a silicon board.

SOLUTION: This device to fix a high polymer relating to organism is composed of a silicon board 1 to which impurities are added, the silicon board 1 has areas 1a and 1b of more than two of different densities of impurities and/or different sorts, and the high polymer relating to organism is adsorbed and fixed by an electrostatic property given to the surface of the board 1, in one side 1b of these areas. The area 1b has a pattern according to the form to catch the high polymer relating to organism to be fixed easily.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-15857

(43)公開日 平成10年(1998)1月20日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|---------|--------|--------------|--------|
| B 25 J 7/00 | | | B 25 J 7/00 | |
| // C 12 M 1/00 | | | C 12 M 1/00 | A |
| C 12 N 11/00 | | | C 12 N 11/00 | |
| 15/00 | | | H 01 L 49/00 | Z |
| H 01 L 49/00 | 9282-4B | | C 12 N 15/00 | Z |
| 審査請求 未請求 請求項の数7 O.L (全14頁) | | | | |

(21)出願番号 特願平8-173731

(22)出願日 平成8年(1996)7月3日

(71)出願人 000002118
 住友金属工業株式会社
 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 三城 明
 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
 住友金属工業株式会社内

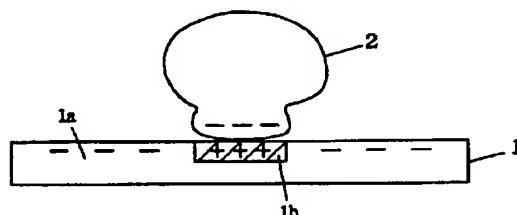
(74)代理人 弁理士 深見 久郎

(54)【発明の名称】 生体関連高分子の固定化装置

(57)【要約】

【課題】 DNA等の生体関連高分子を固定化する装置を、シリコン基板の微細加工技術を用いて提供する。

【解決手段】 生体関連高分子を固定化するための装置は、不純物が添加されたシリコン基板1からなる。シリコン基板は、不純物の濃度および／または種類が異なる2以上の領域1aおよび1bを有し、それらの領域の1つ1bにおいて、基板1の表面にもたらされる静電特性により生体関連高分子を吸着固定する。領域1bは、固定化すべき生体関連高分子のとりやすい形状に応じたパターンを有している。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体高分子および／または生体高分子が含有される生体組織を固定化する装置であって、不純物が添加された特定の材料からなる基材を備え、前記基材は、前記不純物の濃度および／または種類が異なる2以上の領域を有し、それにより、

前記2以上の領域の1つで、前記不純物の添加によって前記基材の表面にもたらされる静電特性により、前記生体高分子および／または前記生体組織を吸着固定することができ、

前記2以上の領域の他の1つで、前記生体高分子および／または前記生体組織の吸着を抑制することができることを特徴とする、生体関連高分子の固定化装置。

【請求項2】 前記2以上の領域の1つが、前記生体高分子および／または前記生体組織の取りやすい形状に応じた所定のパターンを有することを特徴とする、請求項1記載の装置。

【請求項3】 前記所定のパターンは、前記基材上において連續的または断続的に形成されていることを特徴とする、請求項2記載の装置。

【請求項4】 前記所定のパターンは、略円形であることを特徴とする、請求項2または3記載の装置。

【請求項5】 前記所定のパターンは、大きさの異なる複数の略円形であることを特徴とする、請求項2または3記載の装置。

【請求項6】 前記基材に、前記静電特性を制御する電圧を印加するための電極が形成されていることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項記載の装置。

【請求項7】 前記基材は、不純物添加された半導体基板からなることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、マイクロマシン、ナノマシン、シリコンマイクロシステム等と称されるマイクロアセンブリに用いられる生体高分子および／または生体組織を保持、固定化するための装置に関し、特にDNAやRNA等の核酸分子を固定化するための装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、マイクロマシン、ナノマシン、あるいはシリコンマイクロシステム（以下M&Nマシンと略記）と呼ばれる微小機械により、非常に高感度でかつ微小な産業用のセンサや、生体組織内で細胞等の除去や治療作業を行なう医療用の微小ロボットを実現させようという研究が盛んに行なわれている。M&Nマシンは、最近の半導体、特にシリコン集積回路のプロセス技術、特に微細加工技術の飛躍的な進歩によりその実現性が期待されているものである。そして、半導体のうちでも、特にシリコンは微細加工のためのプロセス技術が発達し

ていること、機械的特性に優れていること、集積回路を内蔵することによってワンチップ化・微細化が可能になること、等の理由によって、シリコンを用いた機械の小型化・高性能化が特に期待されている。

【0003】 M&Nマシンのセンサへの用途としては、圧力センサ、加速度センサ、温度センサ、流量計、化学分析用イオンセンサ等が考案されている。このうち、圧力センサへの適用例を図18に示す〔文献：江刺：“半導体マイクロメカニカルマシーニングとセンサ”センサ技術、5巻、P. 114（昭和60年）〕。図18に示す例では、シリコン基板140の裏面側を異方性エッチングにより薄く加工し、ダイヤフラム141を形成している。さらにシリコンダイヤフラム141の表面にはポリシリコンで作製した歪み検出用ゲージ142が設置されている。このもののダイヤフラム141に圧力を印加すると、圧力の大きさに比例してダイヤフラム141が撓み、ダイヤフラム141上のポリシリコン歪みゲージ142の抵抗値が変化する。この変化を電極143を介してブリッジ回路で検出して圧力値を知る仕組みになっている。図18の例に示したように、M&Nセンサの作製においては、シリコン基板の微細加工プロセス技術が重要なことがわかる。

【0004】 次に、M&Nマシンによる生体内での作業ロボットについて説明する。これについては未だ実現された例はないが、1つの試みとして、自走ロボットの移動用の脚として適用することを狙ったアレイ型感知レバーアクチュエータについて説明する。図19にその概略を示す〔文献：N.Takeshima and H.Fujita：“Polyimide Bimorph Actuators for a Ciliary Motion System” 1991 ASME Winter Meeting, DSC-Vol32 (Micromechanical Sensors, Actuators, and Systems), PP.203-209.〕。図19に示す例は、シリコン基板上に熱膨張係数の異なる2種類の薄膜を積層し、このものの垂直方向における変位によって基板を走行させようとするものである。図19において、シリコン基板150上には2種類の熱膨張係数の異なるポリイミド薄膜151および152が、ニクロム配線153（ヒータとして働く）を挟むようにして積層されており、これがシリコン基板150と中空部154を介して隔離されることにより、感知

40 レバーとして機能する。この感知レバーは、初期状態では残留応力のため片方に反っているが、中央のニクロム配線153に電流を流すことにより発熱し、その結果、バイメタルのように反対方向に変位する。この運動を連続的に行なうことによって、生体内を自由に動き回る人工微小ロボットを実現させようとするものである。

【0005】 以上に示したものはM&Nマシンのほんの一例であるが、ここで示したもの以外のものについても、基本となる技術は、シリコン基板を主として用いた微細加工プロセスによって微小な人工システムを実現させようとするものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】医療等の生物学的な分野への応用を狙ったM&Nマシンでは、生体内または生体内と類似の環境下において、種々のセンシング、生体物質の操作・除去、外科的治療等を行なうことを必要としている。その際に、M&Nマシンに生体関連物質や生体組織の保持、固定化を容易に行なうことができるよう機能を付加することが不可欠となる。

【0007】従来の技術において、たとえば特開平6-238578号公報は、微細な物体をピンセットのように把持し、離脱させる装置を開示する。同公報に開示される装置は、開閉可能な1対の把持脚を有する本体と、把持脚を開閉させる静電アクチュエータとを備える。また把持脚の先端部には強誘電体素子が取付けられており、これに電圧を印加することによって分極状態を変化させるようになっている。この装置において微細物体を強誘電体素子の設けられた先端に把持した後、電圧の印加により強誘電体の分極反転を行ない、静電的な反発力を生じさせて微細物体を離脱させようとしている。このような装置においては、微小な先端部分に微細な誘電体素子を取付けるため、その作製は容易ではない。またこのような装置は、生体組織等を所定の場所に保持するための装置としてはその機構が複雑であり、より簡単な機構のものが望まれる。

【0008】本発明の目的は、より簡単な構造において、生体高分子および/または生体組織等をM&Nマシンの特定領域に保持、固定化することのできる装置を提供することである。

【0009】本発明のさらなる目的は、シリコンを主たる半導体基板として用いるM&Nマシンにおいて、シリコン基板の微細加工技術により生体高分子および/または生体組織等を保持、固定化することのできる装置を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、生体高分子および/または生体高分子が含有される生体組織を固定化する装置であって、不純物が添加された特定の材料からなる基材を備える。該基材は、不純物の濃度および/または種類が異なる2以上の領域を有し、それにより、2以上の領域の1つで、不純物の添加によって該基材の表面にもたらされる静電特性により、生体高分子および/または生体組織を吸着固定することができ、2以上の領域の他の1つで、生体高分子および/または生体組織の吸着を抑制することができる。

【0011】本発明の装置において、不純物の濃度および/または種類が異なる2以上の領域の1つは、固定化させようとする生体高分子および/または生体組織の取りやすい形状に応じた所定のパターンを有することができる。このような所定のパターンは、基材上において連続的または断続的に形成することができる。このよ

な所定のパターンは、たとえば略円形とすることができる。後述するように、所定のパターンを略円形として、環状のDNAを選択的に吸着固定する装置を提供することができる。またこのような所定のパターンとして、大きさの異なる複数の略円形を設けることもできる。1つの基材上にサイズの異なる複数のパターンを形成しておけば、サイズの異なる種々の分子（たとえば環状DNA）の固定化に対応することができる。

【0012】本発明の装置において、基材には電極を形成することができる。この電極に電圧を印加することにより、基材表面にもたらされる静電特性を制御することができる。

【0013】本発明に従う固定化装置は、特に、生物および医学の分野におけるM&Nマシンに適用することができる。マイクロマシンは、半導体の微細加工技術（μmレベル）を用いて、主としてシリコン基板において作製された微小機械であり、各種センサ、ロボット等に適用されるものである。ナノマシンは、マイクロマシンの微細加工レベルをさらに上げ、ナノメータレベルの領域まで至らしめたものである。このレベルのマシンでは、分子レベルでの作業や操作が可能となる。

【0014】本発明に従う固定化装置は、不純物元素のドーピングされた半導体結晶から構成することができる。半導体には、シリコン、ゲルマニウム等の単体のもの、GaAs、CdS等の化合物のもの等が含まれる。また本発明に用いられる材料として、不純物元素のドーピングによる価電子制御が可能なものであれば、その他の材料を用いることもでき、たとえば、チタン酸バリウム、チタン酸ストロンチウム等の強誘電材料を用いることもできる。さらに、マトリックス中にドーバントが添加された有機導電性化合物、あるいは、固定化されたイオンを内蔵した絶縁性有機高分子化合物等も用いることができる。

【0015】本発明を構成する材料として、特に好ましいものはシリコン結晶である。シリコン結晶へ不純物元素をドーピングしてN型にする場合には、通常、周期律表第V族の元素を用い、P型にする場合には周期律表第I I I族の元素を用いる。シリコン結晶からなる基板の同一平面上に不純物元素の種類および/または濃度の異なる2以上の領域を形成するためには、たとえばイオン注入法を用いることができる。後述するように、半導体装置の製造プロセスに使われる通常の技術を用いて、本発明に従う所望の固定化装置を得ることができる。

【0016】

【発明の実施の形態】蛋白質や核酸を始めとする生体高分子では、生体内および生体内と類似の環境下において、分子間同士の認識は、ほとんど、幾何学的に特異的な構造および静電的な相互作用（静電斥力・引力、ファンデルワールス力）によって行なわれている。静電的なエネルギーに基づく分子間の相互作用においては、個々の

分子最表面でのわずかな空間的な電荷分布の相違が、分子間の認識の度合、分子集合体の作りやすさに決定的な影響を及ぼすと考えられている。

【0017】本発明者は、生体内での種々の生体構成分子のセンシング、生体物質の固定化、捕獲等を行なうこととして、シリコンに代表される材料を用いてM&Nマシンの研究を進めていく中で、シリコン基板と生体関連高分子（具体的には酵素等に代表される蛋白質分子および生体内で遺伝情報の処理機能を担う核酸分子）とが特異的に吸着反応を起こすことを見出した。たとえば、特定の蛋白質を含有する母液とシリコン基板を透析チューブ内に入れ、これを容器内に満たされた緩衝溶液中に浸漬すると、シリコン表面に蛋白質の結晶が析出してくる一方、その際の結晶化の度合がシリコン基板の種類によって大きく異なることを見出した。たとえば、水溶性蛋白質分子としてあるpH条件下で分子表面の実効表面電荷が負のものを用いると、高抵抗のN型シリコン表面には多くの蛋白質結晶が析出する一方、低抵抗のN型シリコン表面ではほとんど蛋白質の結晶化が起こらないことを見出した。

【0018】この現象は以下のように解釈される。以下、負の実効表面電荷を有する蛋白質分子がシリコン表面と接している場合を考える。高抵抗N型シリコンと低抵抗N型シリコンとを比較すると、ドーパント（たとえばリン原子）の濃度は低抵抗N型シリコンの方が高いため、シリコンの表面近傍で誘起される空間電荷層の空乏層幅は低抵抗N型シリコンの方が狭くなる。よって、空乏層容量は低抵抗N型シリコンの方が高抵抗N型シリコンより大となることから、表面電位は低抵抗N型シリコンの方が高抵抗N型シリコンより小さくなる。

【0019】このシリコン表面の表面電位は正の極性を有することから、負の実効表面電荷、したがって負の表面電位を有する生体高分子と互いに静電的な引力が働くことになる。その際、低抵抗N型シリコンの方が高抵抗N型シリコンより表面電位が低いため、生体高分子に作用する静電引力が弱く、低抵抗N型シリコン上では生体高分子の結晶化が起こりにくくなると考えられる。したがって、負の実効表面電荷を有する生体高分子および/または生体組織とN型シリコン基板が接する場合には、該分子を吸着固定するため、不純物のドーピングにおいてシリコン基板の表面を高抵抗のN型とすることが有効である。また、P型シリコン基板の場合にも同様のドーピングが有効である。

【0020】一方、正の実効表面電荷を有する生体高分子および/または生体組織とP型シリコン基板が接する場合には、分子の固定化のため、シリコン基板の表面が高抵抗P型となるように不純物をドーピングするのが有効である。また、N型シリコン基板を用いる場合にも同様な表面へのドーピングが有効である。

【0021】以上のことから、本発明者は基板に添加さ

れる不純物の濃度および/または種類を制御することにより、生体高分子および/または生体組織を吸着かつ固定化するためのより好ましい静電特性が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち本発明では、図1に示すように、固定化させるべき分子2に対して、異なる静電特性を示す領域1aおよび1bを設け、その中の特定の領域1aにおいて分子2を吸着固定する。基板1において、このような2以上の領域は、添加される不純物の種類および/または濃度を変えることによって形成することができる。図に示すように、領域1aでは生体高分子および/または生体組織の吸着が促進される一方、領域1bでは、それらの吸着が抑制される。後述するように、このような領域は、所定のパターンで形成することができるより好ましい。

【0022】一般に、電解質溶液内における帯電物質または分子の凝集性は、それらの間の電気二重層斥力とファンデルワールス力との和に依存するため、物質または分子同士を凝集させる場合、電解質溶液中に添加する表面電位を調整するための塩濃度を人為的にコントロールすることが非常に重要となる。しかしながら、実際の生体内においてそのような操作はほとんど不可能である。一方、本発明によれば、基材表面の静電特性は、添加される不純物の種類および/または濃度を制御することにより、すなわち価電子制御により予め調整されているため、固定化すべき分子を含む溶液の塩濃度の調整が容易または不要になるというメリットも生じる。このことは、本発明の装置が、M&Nマシンとして生体内で適用するのにより優れていることを意味する。

【0023】生体高分子および/または生体組織を固定化する基材上の領域は、固定化すべき分子または組織の取りやすい形状に応じたパターンにすることがより好ましい。たとえば、固定化すべき分子が円形の形状を取りやすい場合、図2に示すように、基材10上において価電子制御により特定の静電特性を示す固定化領域11もそれに応じた円形とすることが好ましい。生体高分子および生体組織の取り得る形状に即して基材上に形成する固定化領域の形状およびサイズを選択することができる。以下には、DNAを固定化するための装置を具体例として挙げながら本発明をより詳細に説明する。

【0024】固定化すべき分子で特に産業上重要なものとして核酸(DNA等)分子が挙げられる。これは、遺伝子工学の分野において、DNAの組換えおよび遺伝子クローニングの実験を行なう上で核酸の人為的な操作が不可欠となるからである。核酸は、通常、糸状あるいは環状の二重鎖構造を有している。生理的条件下では、核酸の骨格を形成するヌクレオチド鎖のリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの間を結ぶリン酸基は解離しているため、核酸は通常は負に帯電している。したがって、上述したように、不純物がドーピングされた表面を有するシリコン基板を用いることによって、核酸

分子を安定に固定化することが可能である。

【0025】DNAに代表される鎖状あるいは環状の生体高分子を固定化する装置の1具体例を図3に示す。図3(a)に示すように、この装置では、基板表面に複数の円形のパターン21、22、23、24、25および26が形成されている。各円形のパターンは、基材上に形成された二重溝とすることができる。図3(b)は、その断面構造を示している。たとえば高抵抗のN型シリコン($N^- - Si$)20a上に低抵抗のN型シリコン($N^+ - Si$)が形成されたシリコン基板20上に、所定のパターン(円形のパターン)21が形成される。パターン21に相当する部分には、2つの溝21aおよび21b(二重溝)が形成されている。これらの溝は、図3(a)に示すように、略円形の形状を有する。溝21aおよび21bにおいて低抵抗のN型シリコン層20bは除去されており、高抵抗のN型シリコン層20aが露出している。上述したように、負に帯電した分子、たとえば鎖状DNA分子は、高抵抗のN型シリコンで形成される溝に静電的に吸着させ、固定化することができる。このように円形のパターンを基板上に形成することで、環状の高分子、たとえば環状のDNAを選択的かつ効果的に固定化することができる。環状の分子は、円形のパターンに沿って固定化される。固定化のための領域は、たとえば1本の溝でもよいが、図に示すように2本の溝とすることでより効果的な固定化を行なうことができる。DNAのような環状の分子は、フレキシビリティを有するため、円形の溝から外れることもしばしばである。しかし、二重溝が形成された領域においては、分子の鎖のある部分が1つの溝から外れたとしても、もう一つの溝で吸着することができ、分子のフレキシビリティに対応することができる。特に二本鎖であるDNAに対しては、それぞれの鎖のフレキシビリティに効果的に対応することができる。環状の分子を、所定の間隔で離れた二重溝のいずれかに吸着されることによって、安定した固定化を実現することができる。

【0026】また図3(a)に示すように、直径の異なる複数の円形のパターンを形成することが好ましい。図3(a)に示す装置では、各円形が接するようにパターンが設けられている。このようなパターンのほか、たとえば同心円状にパターンを配置することもできる。図3(c)は、図3(a)に示す部分を拡大して示したものであり、パターン21、22および23においてそれぞれ二重溝が形成されているようすを示している。このように異なるサイズの円形領域を1つの基板に複数作製しておけば、サイズの異なる種々の環状分子、たとえば環状DNAを取扱うことが可能になる。DNA分子等の環状分子は、そのサイズに応じた領域に安定して固定化される。図4は、サイズの異なるDNA分子が各パターンに固定化されるようすを示すものである。シリコン基板30において、大きなDNA分子31と小さなDNA分

10

子32とが、それぞれのサイズに相当する円形の領域に固定化される。

【0027】図5および図6に、図3に示すような装置の製造方法の概略を示す。図5に示すプロセスでは、高抵抗のN型シリコンからなる基板40a上に、たとえばP⁺イオンを注入し(図5(a))、低抵抗のN型シリコンからなる層40bを形成する(図5(b))。次いで、CVD等の方法によってSiO₂膜42を形成した後(図5(c))、レジスト43を塗布する(図5(d))。フォトリソグラフィー等によりレジスト43について所定のパターンを形成した後(図5(e))、SiO₂膜42の所定の部分をエッチングする(図5(f))。次いで、エッチングされた領域の低抵抗N型シリコン層40bを異方性エッチングにより除去すれば、所定のパターンで高抵抗N型シリコンを露出させることができる(図5(g))。エッチングされた領域には、溝41aおよび41bを有する所定のパターン41が形成され、固定化のための装置を得ることができる。

【0028】図6に示すプロセスでは、高抵抗N型シリコン基板50aを準備した後(図6(a))、その上にレジスト53を塗布する(図6(b))。次いで、レジスト43について所定のパターンを形成した後、残ったレジストパターンをマスクとしてたとえばP⁺イオンを基板50aに注入する(図6(c))。P⁺イオンが注入されなかった領域に、固定化のためのパターン51が得られる(図6(d))。パターン51では、高抵抗N型シリコン50aが露出しており、その他の領域は低抵抗N型シリコン50bによって覆われている。なお、図示しなかったが、必要に応じて図5または図6に得られる装置の表面に酸化膜等の保護膜を全面的または部分的に形成してもよい。

【0029】図7は、図5および図6でそれぞれ得られた装置における表面電位を示している。固定化すべき生体関連高分子が溶液中で負の解離状態にあるとき、高抵抗のN型シリコン表面における表面電位は正であり、しかも低抵抗シリコン表面の正の表面電位より高くなっている。そこで、二重鎖DNA分子のように溶液中で負に帯電している分子は、図に示すような表面電位の高い2つの領域に選択的に静電結合し、固定化することができる。

【0030】以上に示す装置では、固定化のための領域を比較的狭い線状のパターンとしたが、たとえば図8に示すように、基板上の広い領域に固定化のためのパターンを形成することもできる。図8に示す装置では、シリコン基板60上の円形の領域61全体を固定化のために用いる。このような領域も、上述したプロセスと同様の技術を用いて形成することができる。図9は、比較的広い範囲に固定化のための領域が設けられた場合の表面電位を示している。図に示すように、低抵抗N型シリコン70bまたは70'bで覆われておらず、高抵抗N型シリコン

30

40

50

リコン70aまたは70'aが露出した領域71または71'において表面電位が高くなっている。DNAのような溶液中負に帯電する分子は、この広い領域に固定化することができる。

【0031】DNAおよびDNA類似体は溶液内において二重らせん構造を取るため、分子鎖が一定の間隔で捩じれて存在する方が明らかに安定であると考えられる。このような構造において二重鎖内のリン酸基が負に解離している分子を固定化する場合、分子鎖全体を静電的に固定するよりも、固定化しない領域を所々に設けて、分子鎖内での捩じれに伴うストレスを緩和した方が、より安定な状態で分子を基板表面に固定できると考えられる。

【0032】以上のような見地から、図10に示すような装置を提供することができる。図10に示す固定化装置でも、基板表面には複数の円形のパターン81、82、83および84が形成される。しかしながら、各円形のパターンは、不連続な点在する溝によって構成されている。図10(b)にその断面を示す。たとえば高抵抗のN型シリコン(N⁻-Si)80a上に低抵抗のN型シリコン(N⁺-Si)の層80bが形成された基板80上にパターン81に相当する溝81aが形成されている。この装置でも、図3に示す装置と同様に二重溝を採用している。しかしながら溝は円形に連続的に形成されているのではなく、円形のパターンに沿って断続的に形成されている。図10(a)に示す部分を拡大して図10(c)に示す。パターン81および82にそれぞれ相当する部分には、所定の長さの溝81a、81b、82a、82bが所定の間隔で形成されている。各溝は、上から見ると矩形の形状をしているが、特にそのような形状に限定されるものではない。DNA等の環状分子は、多数の溝によって構成される所定のパターンに安定して固定化することができる。また、サイズの異なる複数の円形パターンを設けることにより、上述したようにサイズの異なる分子の安定化に対応することができる。このように静電的に分子を吸着させる領域を点在させることで、基板表面に固定化される分子の構造的歪みを緩和することができる。

【0033】図10に示す装置も、図11および図12に示すように製造することができる。図11に示すプロセスでは、高抵抗シリコンからなる基板90a上にP⁺イオンを注入して(図11(a))、低抵抗シリコンの層90bを形成する(図11(b))。次いで、CVD等によりSiO₂膜92を形成した後(図11(c))、その上にレジスト93を塗布する(図11(d))。フォトリソグラフィー等を用いることによってレジスト層93を所定のパターンとした後(図11(e))、レジストで覆われていないSiO₂膜をエッチングする(図11(f))。次いで、SiO₂膜で覆われていない領域について異方性エッチングを行ない、

各パターン91に相当する溝91aおよび91bを形成し、固定化のための装置を得る(図11(g))。また図12に示すプロセスでは、高抵抗シリコンからなる基板100aを準備した後(図12(a))、その上にレジスト層103を形成する(図12(b))。次いで、レジスト層103について所定のパターンを形成した後、P⁺イオン等の注入を行なう(図12(c))。イオン注入された領域には低抵抗シリコンからなる層100bが形成され、イオン注入されなかった領域には高抵抗シリコン100aがそのまま残っている。高抵抗シリコン100aが残った領域が固定化のためのパターン101となる(図12(d))。

【0034】図13は、図11および図12においてそれぞれ得られる装置において、表面電位の分布を示している。パターン91または101に相当する高抵抗シリコン90aまたは100aの領域は、低抵抗シリコン90bまたは100bの領域よりも正の表面電位が高くなっている。したがって、溶液中に負に解離する分子は、高い表面電位を有する領域に選択的に吸着され、固定化されることになる。

【0035】また、本発明の装置において、基板に電圧を印加することにより、表面電位を制御することができる。図14は、基板の裏面にバイアス電圧を印加するための電極を設けた構造を示している。たとえば、高抵抗N型シリコン110a上に低抵抗N型シリコン110bが形成された基板110において、表面にはたとえば溝111aおよび111bを有する固定化のための領域111を設け、裏面にはバイアス電圧を印加するための電極117を設けることができる。固定化のための領域111は、線状、円形状などの種々のパターンを有することができる。図では、2つの溝を有するパターンを示したが、これに限定されることなく、種々の形状を有する領域を基板110の上に設けることができる。固定化のための領域が形成された表面は、SiO₂などの絶縁膜116で覆われることがより好ましい。図に示す装置では、上述したメカニズムに従って、高抵抗シリコンの領域にDNA分子等の負に帯電した分子が固定化される。

【0036】図14に示す装置は、たとえば図15および図16にそれぞれ示すプロセスによって製造することができる。図15に示すプロセスでは、高抵抗シリコン基板120aにP⁺イオンを注入し(図15(a))、低抵抗シリコン層120bを形成する(図15(b))。その上にCVD等によりSiO₂膜122を形成した後(図15(c))、さらにレジスト層123を形成する(図15(d))。露光および現像の後、レジスト層123について所定のパターンを形成し(図15(e))、レジストで覆われない部分のSiO₂膜についてエッチングを行なう(図15(f))。さらに異方性エッチングを行なって所定のパターンで低抵抗シリコン層を除去し、高抵抗シリコン基板を露出させる(図

15 (g)。次いで、基板の表面に SiO_2 からなる絶縁膜 126 を形成し、裏面に電極層 127 を形成する(図 15 (h))。このようにして、必要な分子の固定化のため所定のパターン 121 を有する装置が得られる。図 16 に示すプロセスでは、高抵抗シリコン基板 130a を準備した後(図 16 (a))、その上にレジスト層 133 を形成する(図 16 (b))。レジスト層 133 について所定のパターンを形成した後、 P^+ イオン注入を行なう(図 16 (c))。レジストを除去すれば、所定の部分に低抵抗シリコン層 130b が形成された基板が得られる(図 16 (d))。次いで、基板の表面に SiO_2 からなる絶縁膜 136 を形成し、裏面に電極層 137 を設ける。

【0037】図 17 は、固定化装置に電極を介して電圧を印加したときと印加しないときの表面電位をそれぞれ示している。高抵抗シリコン 120a 上に低抵抗シリコン 120b が形成された基板 120 の裏面に電極 127 を介して電圧を印加する場合を示している。なお基板 120 の表面は絶縁膜 126 で覆われている。このように装置において、電圧を印加していないとき、低抵抗シリコンで覆われていない領域 121a および 121b には高い正の表面電位がもたらされる。したがって、溶液中で負に解離した分子は、高い正の表面電荷を有する領域に選択的に静電引力によって吸着固定される。一方、基板 120 の裏面側から電極 127 を介して負のバイアス電圧を印加すると、シリコン内の伝導電子は基板表面の絶縁膜界面に蓄積されるとともに、表面側に形成されていた正の空間電荷層が打消されることになる。結果として、シリコンの表面電位は負に反転することになる。これによって、固定化されていた分子は、静電的な反発力によりシリコン表面から離脱する。このように表面電位の制御によって、分子の吸着および離脱をより積極的に制御することができる。

【0038】本発明に用いられる N 型および P 型のシリコン結晶は、通常の LSI プロセスに用いられるシリコンウェハと同等の特性を有するものでよい。シリコン結晶表面の比抵抗は、 $0.0001 \sim 1000 \Omega \cdot \text{cm}$ 程度の範囲内であることが望ましく、より望ましくは $0.001 \sim 100 \Omega \cdot \text{cm}$ であり、さらに望ましくは $0.001 \sim 10 \Omega \cdot \text{cm}$ である。N 型および P 型に価電子制御されたシリコンの調製方法として、種々のものが考えられ、どのような方式のものでもよいが、最も簡便で不純物濃度の制御が正確に行なえる方法として、イオン注入法が挙げられる。この場合、P 型および N 型の価電子制御は、それぞれ周期律表第 I II 族および第 V 族に属する元素のイオンをシリコン中に注入、アニールすることによって容易に行なうことができる。P 型にするための I II 族元素として B、Al、Ga、In、Tl 等を挙げることができる。特に B が一般的である。N 型にするための第 V 族元素として N、P、As、Sb、Bi 等

を挙げることができ、特に P、As、Sb が一般的である。ドーピングに用いられる周期律表第 I II 族および第 V 族元素の濃度は、 $10^{12} \sim 10^{21} / \text{cm}^3$ の範囲が望ましく、より望ましくは $10^{13} \sim 10^{21} / \text{cm}^3$ であり、さらに望ましくは $10^{14} \sim 10^{21} / \text{cm}^3$ である。また本発明においてシリコン表面に N 型または P 型の不純物層を形成する場合、その厚みは $1 \sim 200 \mu\text{m}$ の範囲が望ましく、より望ましくは $3 \sim 50 \mu\text{m}$ の範囲である。これ以外の範囲では作製が容易でなかったり、効果がなくなるため望ましくない。なお、シリコン結晶の表面は、ミラー・ポリッシュされたものが、余分な結晶核の生成を抑制する上で好ましい。

【0039】本発明の装置において、固定化のための領域は種々のサイズおよび形状とすることができる。たとえば線状の連続した領域を基材上に設ける場合、その幅を $10 \text{ \AA} \sim 0.1 \mu\text{m}$ の範囲で設定することができる。このような範囲は、核酸分子の解離したリン酸基を安定して固定化するためより好ましい。また、核酸分子を固定化するため、不連続な領域を設ける場合、幅が $10 \text{ \AA} \sim 0.1 \mu\text{m}$ で、長さが $20 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲の溝を、 100 \AA から $0.1 \mu\text{m}$ の範囲の間隔で設けることができる。しかしながら、固定化領域の幅、長さ、形状は、固定化すべき分子のサイズ、分子量、とり得る形状等に応じて適宜設定するのがより好ましい。また上述のように、異なる形状および異なるサイズのパターンを固定化のため形成することができる。

【0040】シリコン基板の表面に絶縁性の膜を形成する場合、酸化物、窒化物等の無機絶縁材料、ポリイミド等の有機絶縁材料等、種々の絶縁材料を用いることができる。絶縁膜の厚みは、絶縁性を確保するため $100 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲であれば十分であるが、それ以上の厚みであっても特に差支えはない。

【0041】本発明の装置に形成される裏面電極は、主として金属によって形成することができる。電極のための下地金属として、Ti、Cr 等の金属を $100 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲の厚みでまず堆積することが好ましい。そしてさらにバリアメタルとして、Ni、W、Mo 等の金属を $100 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲で堆積し、その上に上部電極として Cu、Au 等の金属と同じく $100 \text{ \AA} \sim 1 \mu\text{m}$ の範囲で堆積するのがよい。

【0042】以上、価電子制御が容易な半導体結晶であるシリコンを用いた例について説明してきたが、シリコン以外にも、同様の機能を有する物質でかつ固定化すべき物質を含む溶液に対して安定な種々の材料を用いることができる。たとえば、固定化装置を構成するための基材として、電荷分布の制御された無機化合物、有機化合物、有機高分子等を候補として挙げることができる。さらに、半導体、金属、有機化合物、無機化合物等が組合された複合化合物でも固定化のための基材を構成することができる。

【0043】上述したように、本発明の装置において、DNA、RNA等の核酸分子を効果的に固定化することができる。本発明が適用される生体高分子の具体例として、DNA、RNAおよびそれらのポリメラーゼ複合体、遺伝子組換えに用いられるDNA断片、水溶性蛋白質、水溶性蛋白質とDNAとの複合体、主に細胞内に埋込まれた疎水性の膜蛋白質およびその複合体、抗原抗体反応に重要な受容体蛋白質およびそれに関連する酵素類、膜を構成する疎水性蛋白質、細胞内にあって電子伝達を行なう酵素類、纖維状蛋白質、糖類およびそれらの集合体、神経伝達および神経情報を担う神経細胞中の神経伝達物質および受容体蛋白質等の酵素類、ならびにウイルス類等を挙げることができる。一方、本発明が適用される生体組織は、生体中に存在する各種機関を構成する細胞、筋繊維等を指す。生体組織の具体例として、たとえば神経細胞、肝細胞、血液を構成する細胞、筋肉纖維細胞、その他生体組織を構成する細胞等を挙げることができる。

【0044】

【実施例】

例1

DNA分子を固定化するためのシリコン結晶として以下に示すものを作製した。約 $100\Omega\text{cm}$ の比抵抗の高抵抗N型シリコンウェハの全面にイオン注入装置によってリンイオンを約 $2^{14}/\text{cm}^2$ のドーズ量で注入した。得られたシリコンウェハを、窒素中 900°C で20分間アニールした。以上のようにしてウェハ上に形成された低抵抗N型シリコン層の比抵抗は約 $0.1\Omega\text{cm}$ であり、またその接合深さは約 $0.5\mu\text{m}$ であった。

【0045】得られたシリコンウェハを約 10mm 角のサイズに切断し、表面に電子線用のレジストをコーティングした後、電子ビーム露光装置によりシリコン表面に円形の線状パターンを複数描画した。円形パターンのうち1つは、平均直径が $1.5\mu\text{m}$ の二重溝となるようレジストについて描画を行なった。描かれた二重の円の各線幅は 400\AA であった。二重の円を形成する線の中心と中心の間隔は 800\AA であり、したがって線間のスペースは 400\AA であった。

【0046】また、別の円形パターンとして平均直径が $10\mu\text{m}$ の二重溝が形成できるよう描画を行なった。描画された二重の円の線幅、線間のスペースは上記と同様とした。これらサイズの異なる2種類の円形パターンは、同心円上となるよう描画された。

【0047】さらに別のパターンとして、同心円上に描画された円形パターンから $50\mu\text{m}$ 離れた場所に、直径が $10\mu\text{m}$ の円内をすべて露光したパターンを描画した。

【0048】以上のようにして電子線の露光を行なったレジストを現像液によって現像した後、レジストパターンを有するシリコンウェハをプラズマエッティング装置内

に載置し、シリコンのエッティングを行なった。エッティングに際しては、表面に形成されている低抵抗N型シリコン層を完全に除去し、その下にある高抵抗のN型シリコンが露出するよう、慎重にエッティングを行なった。エッティングが完了した後、表面のレジストを除去した。これにより、2種類の二重溝および1つの円形の内部が高抵抗シリコンとなり、それ以外の表面部分が低抵抗シリコンで覆われるシリコンウェハを調製した。なお、エッティングの後、形成された二重溝の寸法を測定した結果、溝の幅は約 700\AA であり、溝の間隔は約 80\AA であった。

【0049】以上のようにして作製されたシリコン結晶からなる固定化装置を、十分洗浄した後、DNA溶液とともに透析チューブ内に封入した。DNAとしては、天然のプラスミドC₀1 E₁由来のプラスミドDNAであるpBR322を用いた。このプラスミドを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにpH=7.0の緩衝溶液に溶解した。DNA溶液とともに固定化装置を封入した透析チューブを、ビーカーに収容したpH12.0の緩衝溶液中に浸漬した。試料の入ったビーカーを 10°C の冷暗所に10時間保存した後、ビーカーを取り出し、さらに透析チューブ内からシリコンウェハのサンプルを注意深く取出した。取出したシリコン片を純水中に3分間浸漬させ、ゆっくり揺動させて溶液を除去した後、自然乾燥を行なった。その後、シリコンの表面を電子顕微鏡によって観察した。その結果、平均直径が $1.5\mu\text{m}$ の二重溝からなる円形パターン上では、それぞれの溝上に一重鎖のプラスミドが固定化されていることが確認された。一方、平均直径が $10\mu\text{m}$ の二重溝からなる円形パターン上では、それぞれの溝にはプラスミドが存在していないかった。また、直径が $10\mu\text{m}$ の円内を高抵抗のシリコンとしたパターンにおいては、円内において一重鎖のプラスミドがランダムに付着していることが確認された。よって、本発明の固定化装置が、鎖状の生体関連高分子、特にDNAの固定化に有効であることが確認された。

【0050】例2

DNA分子を固定化するためのシリコン結晶として以下に示すものを作製した。約 $100\Omega\text{cm}$ の比抵抗の高抵抗N型シリコンウェハの全面にイオン注入装置によってリンイオンを約 $2^{14}/\text{cm}^2$ のドーズ量で注入した。得られたシリコンウェハを窒素中 900°C で2分間アニールした。このようにして形成された低抵抗N型シリコン層の比抵抗は約 $0.1\Omega\text{cm}$ であり、またその接合深さは約 $0.5\mu\text{m}$ であった。

【0051】得られたシリコンウェハを約 10mm 角のサイズに切断し、表面に電子線用のレジストをコーティングした後、電子ビーム露光装置によりレジストについて描画を行なった。描画されたパターンのうち1つは、直径が $1.5\mu\text{m}$ の円であった。ただし、円は、図10に示すように、不連続に多数形成された矩形パターンよ

り構成されている。各矩形パターンのサイズは、幅が300Å、長さが400Åであった。また矩形パターンは、400Åの間隔で形成された。

【0052】また、別のパターンとして、50μm離れた場所に、直径が1.5μmの円内が全面的に露光されたパターンを描画した。

【0053】レジストについて描画を行なったサンプルを現像液によって現像した後、プラズマエッティング装置内に装着し、シリコンについてエッティングを行なった。エッティングに際しては、所定の部分の低抵抗N型シリコン層を完全に除去し、下の高抵抗N型シリコン層が露出するよう、エッティングを慎重に行なった。最後に表面のレジストを除去することにより、DNA分子を固定化するためのシリコン結晶が得られた。得られたサンプルは、高抵抗N型シリコンからなる矩形のパターンが円形に配列された領域と、円形の内部が全面的に高抵抗N型シリコンからなる領域とを有している。エッティングの後、別途行なった測定から、矩形部分のパターンのサイズは、幅が400Å、長さが500Åであった。また各矩形パターンの間隔は500Åであった。

【0054】以上のようにして作製されたサンプルを十分洗浄した後、DNA溶液とともに透析チューブ内に封入した。DNAとして、天然のプラスミドC_o1 E1由来のプラスミドDNAであるpBR322を用いた。このプラスミドを50μg/mlとなるようにpH7.0の緩衝液に溶解し、DNA溶液を調製した。DNA溶液およびシリコン結晶のサンプルを封入した透析チューブは、ビーカーにおいてpH12.0の緩衝溶液に浸漬した。

【0055】試料の入ったビーカーを10℃の冷暗所に10時間保持した後、ビーカーを取り出し、さらに透析チューブ内からシリコンのサンプルを注意深く取出した。取出したシリコン片を純水中に3分間浸漬させ、ゆっくり揺動させて溶液を除去した後、自然乾燥を行なった。その後、シリコン片の表面を電子顕微鏡によって観察した。観察の結果、直径が1.5μmの円形パターン上では、それぞれの矩形に一重鎖のプラスミドが固定化されていることが確認された。また、直径1.5μmの円内が全面的に高抵抗シリコンで形成されている領域では、円内部において、一重鎖のプラスミドがランダムに付着していることが確認された。よって、本発明の固定化装置が、鎖状の生体関連高分子、特にDNAの固定化に極めて有効であることが確認された。

【0056】例3

DNA分子を固定化するためのシリコン結晶として以下に示すものを作製した。約100Ωcmの比抵抗の高抵抗N型シリコンウェハの全面にイオン注入装置によってリンゴンを約214/cm²のドーズ量で注入した。その後、このサンプルを窒素中900℃で20分間アニールした。以上のようにして作製された低抵抗N型シリコ

ン層の比抵抗は約0.1Ωcmであり、またその接合深さは約0.5μmであった。

【0057】得られたシリコンウェハを切断して、約10mm角のサイズのサンプルを2個準備した。それぞれの表面に電子線用のレジストをコーティングした後、電子ビーム露光装置により表面に円形のパターンを描画した。円形のパターンのうち1つは、例2と同様に矩形のパターンから構成される直径1.5μmの円であった。矩形パターンのサイズは、幅が300Å、長さが400Åであった。また矩形パターンの間隔は400Åであつた。

【0058】もう1つのパターンは直径が1.5μmの円内を全面的に露光したものであった。このパターンは、矩形パターンから構成される円から50μm離れた場所に描画した。

【0059】描画を行なったサンプルを現像液によって現像した後、プラズマエッティング装置内に装着し、シリコンのエッティングを行なった。エッティングに際しては、所定の部分の低抵抗N型シリコン層を完全に除去し、下

20 の高抵抗N型シリコン層が露出するよう、注意深くエッティングを行なった。最後に表面のレジストを除去した。得られたシリコン結晶は、高抵抗N型シリコンからなる矩形のパターンが円形に配列された領域と、円形の内部が全面的に高抵抗シリコンからなる領域とを有する。エッティングの後、別途測定を行なった結果、矩形パターンのサイズは、幅が400Å、長さが500Åであった。また、円形に配列された矩形パターンの間隔は500Åであった。

【0060】次に、シリコン基板の裏面に以下に示す方法によって電極を形成した。シリコン基板をスパッタリング装置に載置し、その裏面に、厚み500ÅのTi膜、厚み5000ÅのNi膜、厚み5000ÅのAu膜をそれぞれ順に形成していく。電極膜を形成したサンプルを窒素中、500℃で30分間アニール処理を行なった。

【0061】以上のようにして作製されたサンプルを十分洗浄した後、DNA溶液とともに透析チューブ内に封入した。1つのシリコン片はそのまま透析チューブ内に浸漬し、もう1つのシリコン片は裏面電極に電圧印加用のリード線を接続して透析チューブ内に封入した。DNAとして、天然のプラスミドC_o1 E1由来のプラスミドDNAであるpBR322を用いた。このプラスミドを50μg/mlとなるようにpH7.0の緩衝溶液に溶解してDNA溶液を調製した。シリコン片を封入した透析チューブは、ビーカーにおいてpH12.0の緩衝溶液に浸漬した。

【0062】試料の入ったビーカーを10℃の冷暗所に10時間保存した後、ビーカーを取り出し、さらに透析チューブ内からシリコンのサンプルを注意深く取出した。その際、2つのシリコン片のうち1つはそのまま取出

し、シリコン片を純水中に3分間浸漬させ、ゆっくり揺動させて溶液を除去した後、自然乾燥を行なった。もう1つのシリコン片は、透析チューブ内にさらに保持し、外部よりリード線を介して電源から-5Vの直流電圧を3分間印加した。その後、チューブより取出し、同様の方法によって溶液を除去し、乾燥を行なった。

【0063】それぞれのシリコン片について表面を電子顕微鏡によって観察した。その結果、裏面電極に電圧を印加しないシリコン片では、直径が1.5μmの円形パターンにおいてそれぞれの矩形パターンに一重鎖のプラスミドが固定化されていることが確認された。また直径1.5μmの円内を全面的に高抵抗シリコンで形成したパターンでは、その中に一重鎖のプラスミドがランダムに付着していることが確認された。一方、裏面電極に電圧を印加したシリコン片では、どのパターンにもプラスミドが固定化されていなかった。したがって、本発明の固定化装置は、鎖状の生体関連高分子、特にDNAの固定化に有効であるのみならず、電圧の印加によりその離脱を極めて有効に行なえるものであることが確認された。

【0064】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、所望の生体関連高分子、特に鎖状のDNA分子を固定化および離脱させるための装置を、容易に入手できる材料について単に不純物の添加および微細加工を施すだけで容易に作製することができる。特に本発明によれば、シリコンを主たる半導体基板として用いるM&Nマシンにおいて、生体関連高分子を固定化および離脱させるための装置を、ドーピングの技術および微細加工の技術を用いることによって容易に作製することができる。本発明の固定化装置は、固定化すべき分子の形状に応じた固定化領域を容易に形成することができ、特定のサイズおよび形状を有する生体関連高分子を選択的かつ効率的に固定化することが可能である。また、サイズおよび/または形状の異なる種々の固定化領域を形成することにより、1つの装置においてあらゆる種類の生体関連高分子の固定化を行なうことが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の装置において生体関連高分子が固定化される様子を示す模式図である。

【図2】本発明の装置の一具体例を示す斜視図である。

【図3】本発明の装置のもう1つの具体例を示す図である。

10

【図4】本発明の装置においてサイズの異なるDNA分子がそれぞれ固定化される様子を示す斜視図である。

【図5】図3に示す装置の製造方法を説明するための概略断面図である。

【図6】図3に示す装置のもう1つの製造方法を説明するための概略断面図である。

【図7】図5および図6で得られる装置における表面電位を示す図である。

【図8】本発明の装置の他の具体例を示す斜視図である。

【図9】図8に示す装置において表面電位の分布を示す図である。

【図10】本発明の固定化装置のさらなる具体例を示す図である。

【図11】図10に示す装置を製造するためのプロセスを示す概略断面図である。

【図12】図10に示す装置を製造するためのもう1つのプロセスを示す概略断面図である。

【図13】図11および図12で得られる装置における表面電位の分布を示す図である。

20

【図14】本発明の固定化装置のさらなる具体例を示す概略断面図である。

【図15】図14に示す装置の製造方法を説明するための概略断面図である。

【図16】図14に示す装置のもう1つの製造方法を説明するための概略断面図である。

【図17】本発明の固定化装置にバイアス電圧を印加した場合の表面電位の変化を示す図である。

【図18】従来のM&Nマシンセンサの例を示す斜視図である。

【図19】従来のM&Nマシンアクチュエータの例を示す図である。

【符号の説明】

1 基材

2 生体関連高分子

10 基材

11 固定化領域

21、22、23、24、25、26、81、82、83、84 円形パターン

30

40a、50a、70a、80a、90a、100a、

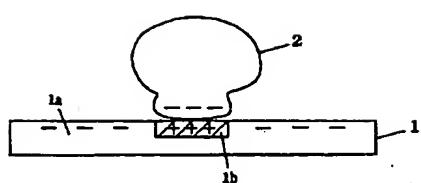
110a、120a、130a 高抵抗N型シリコン

40b、50b、70b、80b、90b、100b、

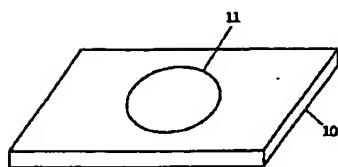
110b、120b、130b 低抵抗N型シリコン

40

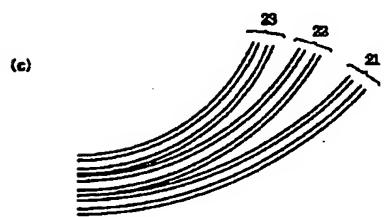
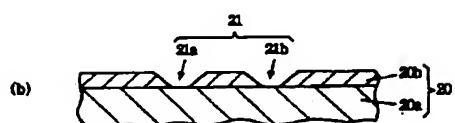
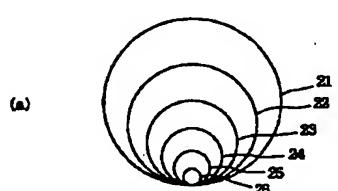
【図1】



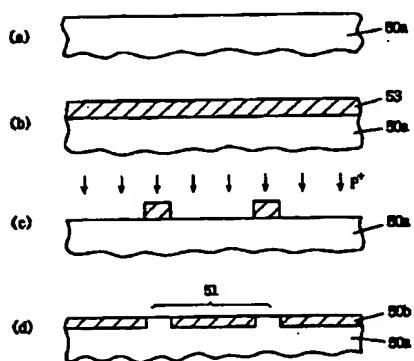
【図2】



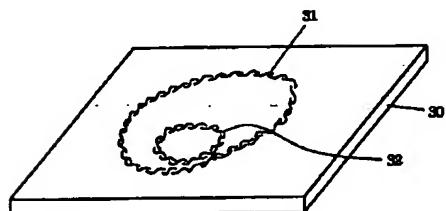
【図3】



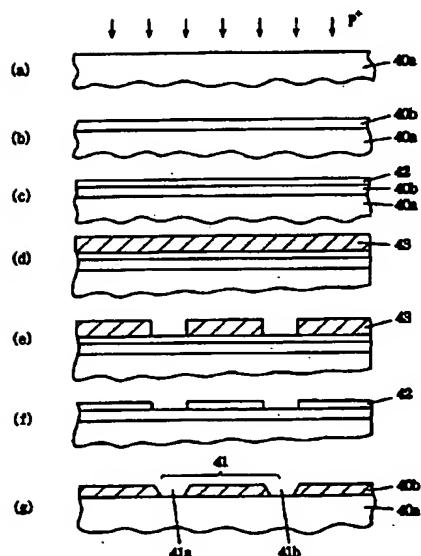
【図6】



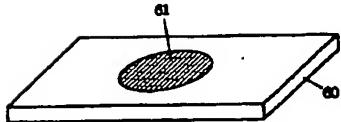
【図4】



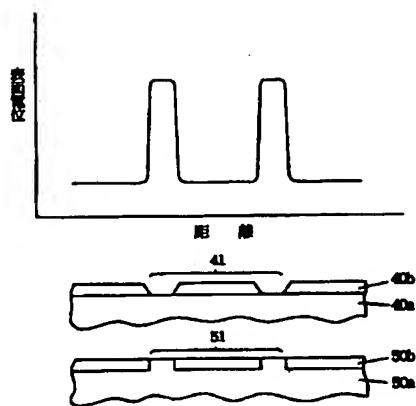
【図5】



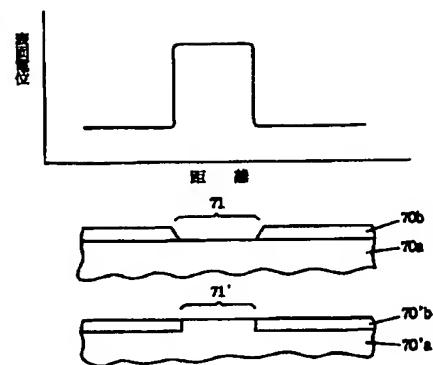
【図8】



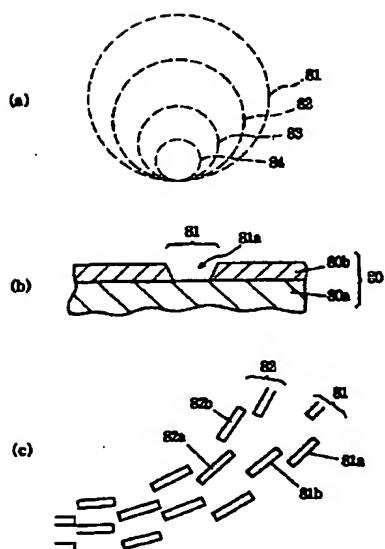
【図7】



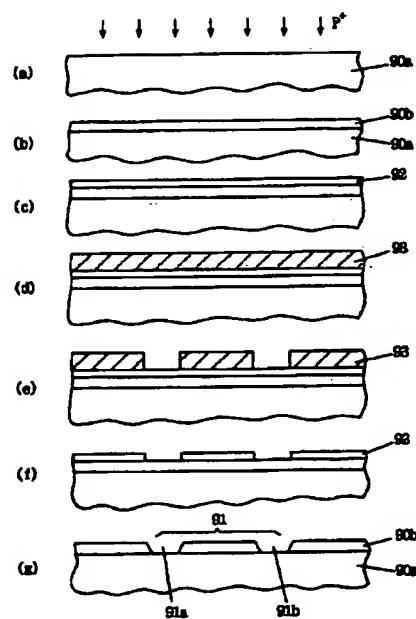
【図9】



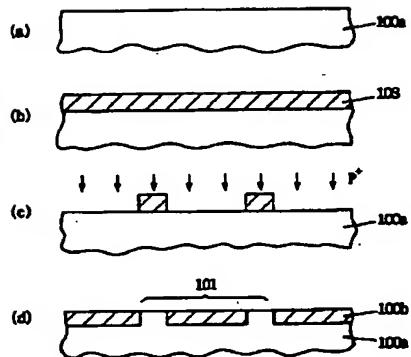
【図10】



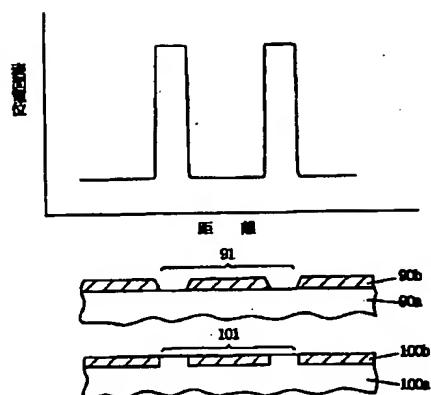
【図11】



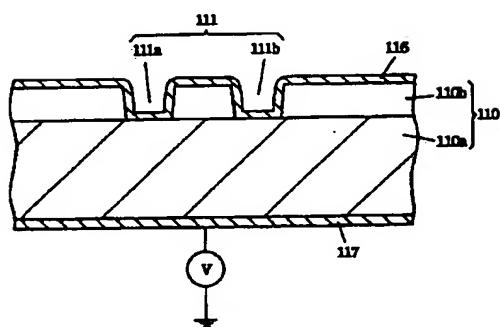
【図12】



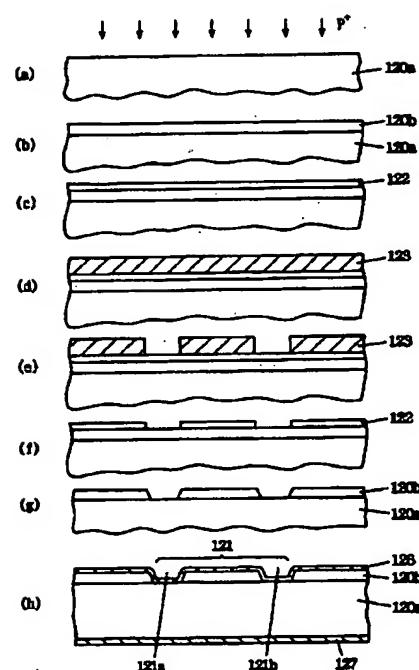
【図13】



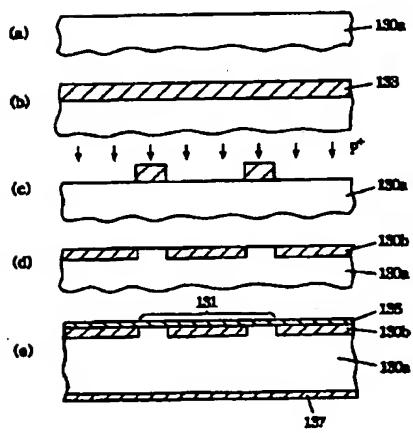
【図14】



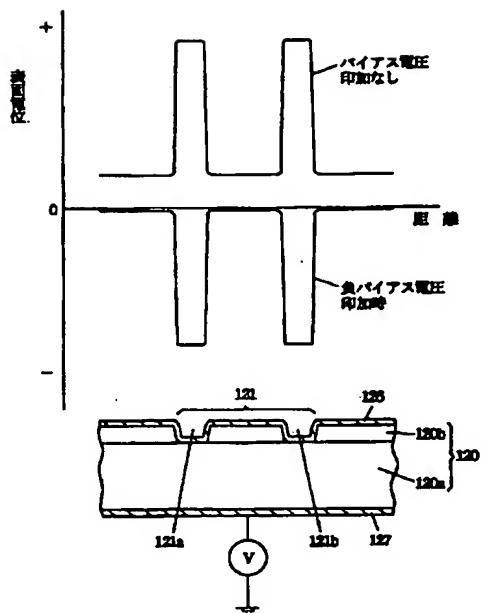
【図15】



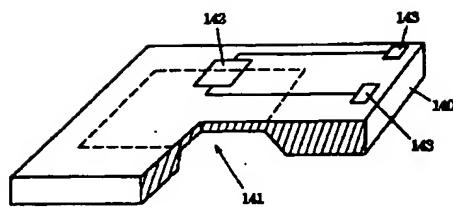
【図16】



【図17】



【図18】



【図19】

